

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 17, 1979, pp. 363–367

Eine radioenzymatische Mikromethode zur Bestimmung der UDP-Glucuronsäure

Von W. Lehnert, Th. O. F. Wagner, M. W. Fürst und W. Künzer

Univ.-Kinderklinik, (Direktor: Prof. Dr. W. Künzer) Freiburg i. Br.

(Eingegangen am 10. August 1978/6. Februar 1979)

Zusammenfassung: Es wird eine neue empfindliche und spezifische Mikromethode zur Bestimmung der UDP-Glucuronsäure beschrieben. Hierbei werden Extrakte aus 2,5 mg Gewebe mit Hilfe der UDP-Glucuronyltransferase aus gewaschenen Meerschweinchenmikrosomen mit [^{14}C]p-Nitrophenol inkubiert und der Umsatz an UDP-Glucuronsäure aus dem Verhältnis von entstandenem [^{14}C]p-Nitrophenylglucuronid und überschüssigem [^{14}C]p-Nitrophenol sowie der eingesetzten Menge an [^{14}C]p-Nitrophenol bestimmt. Verluste durch nicht vollständige Umsetzung und Nebenreaktionen werden durch einen Kalibrierwert, der zum normalen Inkubationsansatz zusätzlich eine bekannte Menge UDP-Glucuronsäure enthält, kompensiert. Für eine Bestimmung reichen Gewebsmengen, wie sie z. B. durch Leberblindpunktion bei Neugeborenen erhalten werden können (5–10 mg). Der Variationskoeffizient der Bestimmungen beträgt $\pm 2.3\%$. Der UDP-Glucuronsäure-Gehalt der Mäuseleber wurde zu $171 \mu\text{mol/kg}$ ($n = 6$) bestimmt.

Radioenzymatic micromethod for the determination of UDP-glucuronic acid

Summary: A new sensitive and specific micromethod for determination of UDP-glucuronic acid is described. Extracts from 2.5 mg of liver are incubated with twice washed guinea pig microsomes (as a source of UDP-glucuronyl transferase) and [^{14}C]p-nitrophenol. The content of UDP-glucuronic acid is calculated from the [^{14}C]p-nitrophenyl glucuronide/[^{14}C]p-nitrophenol radioactivity ratio and the known amount of introduced [^{14}C]p-nitrophenol. These values are corrected for losses of UDP-glucuronic acid by a calibration experiment, containing, in addition to the aforementioned constituents, a known amount of UDP-glucuronic acid. The mean concentration of UDP-glucuronic acid in mice liver was found to be $171 \mu\text{mol/kg}$ wet weight.

Einführung

Für die Entstehung des physiologischen Neugeborenenikterus werden vornehmlich drei Gründe verantwortlich gemacht:

1. Störungen in der Aufnahme des Bilirubins durch die Leber,
2. die Unreife der UDP-Glucuronyltransferase, die das Bilirubin mit Glucuronsäure koppelt und dadurch gallengängig macht, sowie
3. Exkretionsstörungen der Leber.

Daneben gibt es Anhaltspunkte für eine verminderte Aktivität der UDP-Glucose-Dehydrogenase in der perinatalen Leber (1, 2). Da die UDP-Glucose aber Vorläufer der UDP-Glucuronsäure ist, sollte auch ein Mangel an UDP-Glucuronsäure in Erwägung gezogen werden. Diese Möglichkeit ist von Schröter & Eggerling (3) sowie von

Felsher et al. (2) in diesem Zusammenhang bereits diskutiert worden.

Die vorliegende Arbeit soll zu diesem Themas insofern einen Beitrag leisten, als eine empfindliche und spezifische Mikromethode zur Bestimmung der UDP-Glucuronsäure beschrieben wird, zu deren Durchführung schon 5–10 mg Gewebe ausreichen. Bisher sind UDP-Glucuronsäure-Bestimmungen nur vereinzelt beschrieben worden. So setzten Wong & Sourkes (4) einen durch Kochen, Homogenisieren und Zentrifugieren gewonnenen Leberextrakt in Gegenwart von UDP-Glucuronyltransferase mit Harmol um und bestimmten das gebildete Glucuronid nach Dünnschichtchromatographie fluoreszenzspektroskopisch. Die benötigte Lebermenge betrug ca. 100 mg/Bestimmungsansatz. Gegen das Kochen von Verbindungen mit einer chemisch recht labilen Glykosidbindung sind, zumindest beim Arbeiten im Mikrobereich, Bedenken angebracht.

Für die von Zhivkov (5) beschriebene Methode, nach der Leber mit Perchlorsäure homogenisiert, danach ein Nucleotidohextract durch Chromatographie über einen Ionenaustauscher hergestellt, dieser papierchromatographisch aufgetrennt und die isolierte UDP-Glucuronsäure UV-spektroskopisch bestimmt wird, ist 1 g Leber/Ansatz erforderlich. Die Dauer einer Bestimmung beträgt mindestens 3 Tage.

Keppler et al. (6) adsorbieren die Nucleotide an Holzkohle, trennen sie nach Auswaschen papierchromatographisch und bestimmen sie sodann enzymatisch. Auch hier werden 1 g Lebergewebe benötigt und die Prozedur dauert drei bis vier Tage. Zuletzt sei eine weitere Mikromethode von Wong (7) erwähnt, bei der die UDP-Glucuronsäure an [^{14}C]Tyramin gekoppelt, das Glucuronid papierchromatographisch abgetrennt, seine Radioaktivität gemessen und die entsprechende UDP-Glucuronsäure-Menge an einer mit der jeweiligen Mikrosomenpräparation sich ändernden Standardkurve abgelesen wird. Zur Durchführung der Bestimmung werden immer noch 60 mg Gewebe benötigt. Einschränkend muß gesagt werden, daß auch hier der Gewebsextrakt durch Kochen gewonnen wird. Die Dauer der Bestimmung beträgt 24 h.

Bei der von uns entwickelten Methode zur Bestimmung der UDP-Glucuronsäure wird ein alkoholischer Leberextrakt nach Entfernen des Alkohols mit gewaschenen Meerschweinchenmikrosomen als UDP-Glucuronyltransferase-Quelle und einer bekannten Menge an [^{14}C]p-Nitrophenol inkubiert und die UDP-Glucuronsäure-Konzentration nach Extraktion und dünnstichtchromatographischer Trennung des überschüssigen [^{14}C]p-Nitrophenols von seinem Glucuronid berechnet. Zur Korrektur des nicht vollständigen UDP-Glucuronsäure-Umsatzes und der während der Prozedur eventuell auftretenden Verluste wird ein zweiter Bestimmungsansatz mitgeführt, dem am Anfang außer dem Zellextrakt eine bekannte Menge an UDP-Glucuronsäure zugesetzt worden ist.

Bezüglich der biochemischen und chromatographischen Bedingungen konnten wir auf eigene gute Erfahrungen im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Mikromethode zur Bestimmung der UDP-Glucuronyltransferase zurückgreifen (8). Mit der hier beschriebenen Methode lassen sich an einem Arbeitstag 6 und mehr Proben bewältigen.

Material und Methoden

Chemikalien

UDP-Glucuronat, di-Natriumsalz, Boehringer Mannheim. [^{14}C]p-Nitrophenol, spez. Aktivität $2,98 \times 10^8$ Bq/mmol (8,06 mCi/mmol), ICN Tracerlab, über Amersham-Buchler, Braunschweig. p-Nitrophenyl- β -D-glucuronid, p-Nitrophenyl- β -D-xylopyranosid, p-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid, Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.

p-Nitrophenyl- β -D-glucosid, p-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid, Sigma Chemie GmbH, München.

UDP-Glucose, -Xylose, -Galaktose, -N-Acetylglucosamin als Na-Salze, Sigma Chemie, München.

p-Nitrophenol p.a., Eisessig p.a., 2,5-Diphenyloxazol (PPO), 2,2'-p-Phenyl-bis-(5-phenyloxazol) (POPOP), Naphthalin für die Szintillationsmessungen, Methanol p.a., Dioxan p.a., Cellulose-F-Dünnschichtplatten 10×20 cm, E. Merck, Darmstadt, Hyamine-10-X-Hydroxyde, 1 mol/l in Methanol, Packard Instr. Frankfurt/M.

Ethanol absol. (vgl. l.c. (8)).

Lösungen

Inkubationslösung: 10 ml Kaliumchlorid-Lösung (66 mmol/l), 3 ml Natriumphosphatpuffer (200 mmol/l, pH 7,4), 1 ml Magnesiumchlorid-Lösung (300 mmol/l) und 10 ml isotonische alkalische Kaliumchlorid-Lösung (154 mmol/l Kaliumchlorid und 0,32 mmol/l Kaliumhydrogencarbonat).

UDP-Glucuronat-Lösung: 3,75 mg/l 86% di-Natrium-UDP-glucuronat in bidest. Wasser = 5,16 $\mu\text{mol/l}$.

p-Nitrophenol/p-Nitrophenylglucuronid-Gemisch: 1 ml p-Nitrophenol-Lösung (1 mmol/l in bidest. Wasser) 0,1 ml p-Nitrophenyl- β -D-glucuronid-Lösung (1 mmol/l), 2 ml Salzsäure (25 mmol/l) und 6 ml bidest. Wasser.

Diatol: 3,25 g PPO, 65 mg POPOP, 65 g Naphthalin, 150 ml Methanol, 250 ml Toluol, 250 ml Dioxan.

Geräte

Potter-Elvehjem-Glashomogenisator, 50, 25, 15 und 2 ml.

Motor mit konstanter und reproduzierbar einstellbarer Umdrehungszahl, Cole-Parmer Instr. Comp., Chicago, Ill. 60648.

Labor-Kühlzentrifuge mit Ausschwingrotor, $R_{av} = 17,5$ cm und Kühlzentrifuge, Zeta 20 mit Festwinkelrotor, $R_{av} = 11,5$ cm, Heraeus-Christ, Osterode.

Ultrazentrifuge, Spinco L2 65B mit Festwinkelrotor 50 Ti, $R_{av} = 5,9$ cm, 40 000 U/min = 105 000 g, Beckman Instr., Fullerton Calif., U.S.A. Rotationsverdampfer mit „Spinne“, sechs- und zwölfarmig, NS 14,5, Büchi, Flavi, Schweiz.

Präzisionspritzen, 50 μl , Hamilton, Whittier, Calif., U.S.A. Flüssig-Szintillationspektrometer, TriCarb, Mod. 3375, Packard Instr., Frankfurt/M.

Schwingmühle mit Edelstahl-Mahlkapsel und -Kugel, Bodenseewerke Perkin-Elmer, Überlingen.

Durchführung der Versuche

Mikrosomenpräparation

Das Mikrosomenpräparat wurde aus Meerschweinchenleber nach Schneider & Hogeboom (9) gewonnen. Nach zweimaligem Waschen mit frischer, eiskalter Inkubationslösung verteilt man 1 g Mikrosomen durch Homogenisieren (1 min, 300 U/min, 1°C) in 40 ml Inkubationslösung und friert diese Suspension in kleinen Portionen bei -20°C ein.

Gewebeextrakt

Einem in Äthernästhesie dekapitierten und entbluteten Versuchstier entnimmt man möglichst schnell ein Stück Leber und friert es zwischen zwei auf Temperaturen des flüssigen Stickstoffes gebrachte Glasplatten ein (zwei mit den Böden aufeinanderstehende Petri- oder Abdampfschalen, deren obere mit flüssigem Stickstoff gefüllt ist). Biopsiezylinder werden in eiskalte physiologische NaCl-Lösung gespritzt, mit einer Präpariernadel aufgelesen, auf einem Filterpapierstreifen abgetropft und anschließend sofort wie oben beschrieben auf -196°C gebracht. Man wiegt die eingefrorenen Leberproben auf einem Stück tiefgefrorenen Parafilms schnell aus und bringt sie sofort wieder zwischen die gekühlten Glasplatten oder direkt in einen Glas-homogenisator mit 2 ml auf -40°C vorgekühltem absolutem Ethanol. Es wird nun ohne weitere Kühlung bei 500 U/min 5 min homogenisiert, wobei man zunächst das harte Gewebestück zerbricht und die Bruchstücke möglichst vor dem Anstei-

gen der Temperatur auf 0°C zermahlt. Man überführt die Suspension in ein 10-ml-Zentrifugenglas mit NS 14,5 und spitzem Boden, spült Homogenisator und Stempel dreimal sorgfältig mit Ethanol ab und dampft im Wasserstrahlvakuum bei 30°C am Rotationsverdampfer zur Trockene ein. Das trockene, denaturierte Leberhomogenat wird mit 40 µl bidest. Wasser je mg Leberfrischgewicht versetzt, gut durchmischt und anschließend in der Laborzentrifuge zentrifugiert (5 min, 3000 U/min, 1°C). Der Überstand (Gewebeextrakt) enthält in 100 µl die UDP-Glucuronsäure aus 2,5 mg Leber.

Inkubation

Man pipettiert in 4 mit Eiswasser gekühlte Zentrifugengläser jeweils 100 µl Mikrosomensuspension, 100 µl Gewebeextrakt und in zwei der Röhrchen, die man als „Kalibrierbestimmung“ kennzeichnet, zusätzlich je 100 µl UDP-Glucuronsäure-Lösung (516 pmol). Anschließend werden mit einer Mikroliterspritze zu jeder Probe präzise 30 µl [¹⁴C]-p-Nitrophenol-Lösung (14,88 nmol) hinzugegeben, die Röhrchen mit Parafilm verschlossen und in einem Schüttelwasserbad bei einer Neigung von ca. 30°C 60 min bei 37°C inkubiert.

Aufarbeitung der Proben

Man beendet die Inkubation durch Kühlen der Gläschen mit Eiswasser und sofortige Zugabe von je 2 ml absol. Alkohol. Die Proben werden mit je 1 ml p-Nitrophenol/p-Nitrophenylglucuronid-Lösung versetzt, auf eine Spinne gesteckt, 10 min mit Eiswasser vorgekühlt und an den Rotationsverdampfer gehängt. Um ein Verspritzen der Proben zu vermeiden, läßt man die Spinne so lange in der Luft rotieren, bis sich das volle Wasserstrahlvakuum eingestellt hat (etwa 5 min), taucht dann in ein 30°C warmes Wasserbad und dampft zur Trockene ein. Der Rückstand wird in 0,5 ml absol. Ethanol aufgenommen, wobei die gesamte Innenwand des Röhrchens zu benetzen ist. Nach kurzem Zentrifugieren (5 min, 3000 U/min, 1°C) hebert man, ohne den Bodensatz zu berühren (!), je 0,4 ml vom Überstand in ein zweites Röhrchen, dampft wie oben beschrieben zur Trockene ein, nimmt den Rückstand in je 50 µl absol. Alkohol auf, wobei die untere Hälfte der Röhrchen benetzt werden sollte und zentrifugiert kurz wie oben. Vom Überstand werden je 20 µl, der Bodensatz soll auch hier nicht mit der Pipette berührt werden, in etwa 4 Portionen auf Cellulose-F-Dünnschichtplatten 2,5 cm vom linken und unteren Rand aufgetragen und gründlich getrocknet. Man chromatographiert anschließend etwa 3 h mit Wasser/Eisessig (Volumina, 100 ml + 1 ml).

Auswertung

Um die im UV-Licht sichtbaren p-Nitrophenol- (R_F ca. 0,6) und p-Nitrophenylglucuronid-Flecke (R_F ca. 0,9) zeichnet man mit Bleistift Rechtecke von 3 × 2,5 bzw. 3 × 3 cm (hier, ohne die Lösungsmittelfront mit einzubeziehen), schabt die markierten Areale mit einem Spatel ab, überführt die Cellulose mit Hilfe von Glanzpapier in PVC-Szintillationsröhrchen und versetzt mit je 1 ml Hyamine-10-X-Hydroxyd-Lösung (schütteln), 0,1 ml Eisessig (schütteln) und 10 ml Diatol (schütteln). Nach Abklingen evtl. vorhandener Eigenlumineszenz wird im Flüssigkeitszintillationsspektrometer gezählt. Die UDP-Glucuronsäure-Menge errechnet sich nach folgender Gleichung:

UDPGlcUA (vorh.) =

$$\frac{\left(\frac{\text{Akt}_{p\text{-NPHG}}}{\text{Akt}_{p\text{-NPH}} + \text{Akt}_{p\text{-NPHG}}} \right) \text{Probe} \times 0,516}{\left(\frac{\text{Akt}_{p\text{-NPHG}}}{\text{Akt}_{p\text{-NPH}} + \text{Akt}_{p\text{-NPHG}}} \right) \text{Kalibr.} - \left(\frac{\text{Akt}_{p\text{-NPHG}}}{\text{Akt}_{p\text{-NPH}} + \text{Akt}_{p\text{-NPHG}}} \right) \text{Probe}}$$

Hierbei bedeutet Akt_{p-NPH} und Akt_{p-NPHG} die gemessene Radioaktivität der entsprechenden p-Nitrophenol- bzw. p-Nitrophenylglucuronid-Flecken. 0,516 ist die zur Kalibrierprobe zugesetzte Menge an UDP-Glucuronsäure in nmol/2,5 mg Gewebe. Die in der Probe vorhandene und zu messende UDP-Glucuronsäure-Menge UDPGlcUA vorh. hat die Dimension nmol/2,5 mg Gewebe.

Ergebnisse und Diskussion

Nachdem die Entwicklung einer Mikromethode zur Bestimmung der UDP-Glucuronyltransferase-Aktivität mit p-Nitrophenol als Substrat (8) hinsichtlich der Reproduzierbarkeit zu guten Ergebnissen geführt hatte, war es naheliegend, diese Erfahrungen auch für eine Mikromethode zur Bestimmung der UDP-Glucuronsäure zu nutzen. Nach ersten Vorversuchen zeigte sich, daß ein vollständiger Umsatz der UDP-Glucuronsäure zum p-Nitrophenylglucuronid nicht zu erreichen war, da offenbar ein nicht unwesentlicher Anteil im Inkubationsansatz entweder anderweitig verbraucht oder nicht umgesetzt wurde. Für Nebenreaktionen könnten die UDP-Glucuronat-Pyrophosphatase sowie die β-Glucuronidase verantwortlich gemacht werden. Wie Pogell et al. (10) gezeigt haben, ist die UDP-Glucuronat-Pyrophosphatase, deren pH-Optimum bei pH 9 liegt, in Meerschweinchenmikrosomen kaum nachweisbar. Die Aktivität der β-Glucuronidase, mit einem pH-Optimum von pH 5,0 ist bei einem pH von 7,4 zu vernachlässigen (11). Um die während der Inkubation wie auch immer eintretenden UDP-Glucuronsäure-Verluste zu berücksichtigen, mußte ein Kalibrierverfahren eingeführt werden. Wir ließen daher parallel zu den Bestimmungsansätzen Kalibrieransätze laufen, denen bekannte Mengen an UDP-Glucuronsäure zugemischt wurden, die sonst aber mit den Bestimmungsansätzen identisch waren. Im gemessenen Bereich zwischen 0 und 1,45 nmol UDP-Glucuronsäure/Ansatz erhielten wir eine Gerade, die durch den Nullpunkt geht (Abb. 1) und der Beziehung $y = 1,9 x$ gehorcht. Der Bestimmtheitsgrad r^2 (Maß für die Güte der Anpassung) beträgt 0,9998. Eine spätere Wiederholung dieses wichtigen Versuches

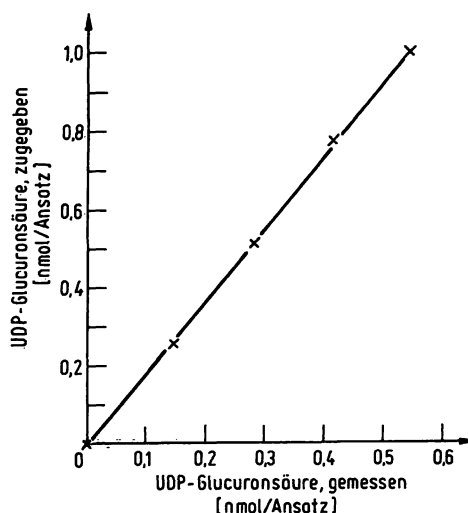


Abb. 1. Abhängigkeit der gefundenen von der eingesetzten UDP-Glucuronsäure-Menge.

Inkubationsansatz: Es werden 0–1,03 nmol UDP-Glucuronsäure mit je 100 µl Gewebeextrakt, 30 µl [¹⁴C]-p-Nitrophenol-Lösung und 100 µl Mikrosomensuspension nebst einem Leerwert (ohne UDP-Glucuronsäure-Zugabe und ohne Gewebeextrakt) 1 h bei 37°C inkubiert.

Es resultiert eine Gerade, die durch den Nullpunkt geht ($y = 1,9 x$). Zur Korrektur der Meßwerte ist daher jeweils ein Kalibrierpunkt ausreichend.

mit einer anderen Mikrosomenpräparation und von einer anderen Person durchgeführt, ergab ebenfalls eine Gerade durch den Nullpunkt ($y = 1,6 x$; $r^2 = 0,997$). Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß das Erstellen von Standardkurven nicht notwendig ist. Es reicht ein mit jeder Bestimmung mitzuführender Kalibrierpunkt.

Um auszuschließen, daß neben UDP-Glucuronsäure im Gewebeextrakt möglicherweise ebenfalls vorhandene UDP-Glucose, -Xylose, -Galaktose und -N-Acetylglucosamin fälschlicherweise als UDP-Glucuronsäure mitbestimmt werden, wurden diese Nucleotide mit [^{14}C]p-Nitrophenol und Mikrosomen wie üblich inkubiert. Parallel dazu liefen zur Kontrolle Ansätze mit UDP-Glucuronsäure. Wie die autoradiographische Auswertung und Messungen der Dünnschichtplatten mit einem Dünnschichtscanner zeigten, wurde zwar immer p-Nitrophenylglucuronid, nie aber Konjugat der Zucker mit p-Nitrophenol gefunden. Zu gleichen Ergebnissen kommt auch Wong (7) mit [^{14}C]Tyramin als Substrat.

Um zu prüfen, welche Art der Gewinnung des Gewebeextraktes die geeignetere ist, haben wir aus zwei benachbarten Leberstückchen der Maus einen Extrakt wie üblich und einen durch Kochen (3 min) in bidest. Wasser gewonnen und die UDP-Glucuronsäure bestimmt. Während nach Denaturierung mit Alkohol in der Kälte 172 μmol gemessen wurden, enthielt die gekochte Probe nur noch 128 $\mu\text{mol/kg}$ UDP-Glucuronsäure, also ca. 25% weniger! Wir halten daher, zumindest bei Mikrobestimmungen, das Kochen von Gewebeproben zur Extraktion von UDP-Glucuronsäure für unzulässig.

Um zu klären, ob nicht schon während des Ausblutens des Tieres und des Einfrierens der Leberprobe ein Teil der unter physiologischen Bedingungen vorhandenen UDP-Glucuronsäure verloren geht, haben wir je zwei ätherbetäubten Mäusen nach Laparotomie je ein Stück Leber in situ durch Quetschen zwischen zwei -196°C kalte Platten eingefroren und entnommen und nach Dekapieren und Entbluten der Tiere je eine Probe wie üblich gewonnen. Tabelle 1 (Maus A und B) zeigt, daß ein Einfrieren der Proben in situ nicht notwendig ist.

Hingegen nimmt der UDP-Glucuronsäure-Gehalt von Leberstückchen, die verschieden lange in physiologischer NaCl-Lösung bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, sehr schnell ab (Abb. 2). Nach 3 min ist nur noch 63% der anfänglichen Menge vorhanden. Proben sollten also unmittelbar nach der Entnahme tiefgefroren werden.

Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, bleibt die UDP-Glucuronyltransferase-Aktivität von gewaschenen Meerschweinchenmikrosomen beim Aufbewahren bei -20°C über 12 Wochen nahezu konstant, um dann langsam abzufallen.

Tabelle 1 zeigt die gute Übereinstimmung der Werte bei Mehrfachbestimmungen. Der aus 20 Doppelbestim-

Tab. 1. Gemessene UDP-Glucuronsäure-Konzentrationen in Mäuseleber (bei Einfrieren der Proben nach Entnahme bzw. in situ) und in der Leber von zwei Patienten. Es handelt sich jeweils um den Mittelwert von Doppelbestimmungen.

Untersuchungs- material	UDP-Glucuronsäure-Gehalt der Leber [$\mu\text{mol/kg}$]	
	Nach Entnahme eingefroren	In situ eingefroren
Maus A	170 \pm 2	168 \pm 3
B	168 \pm 3	169 \pm 2
C	152 \pm 4	
D	201 \pm 2	
E	164 \pm 1	
E	168 \pm 2	
F	170 \pm 1	
F	172 \pm 3	
Patient M.D., ♀, 6 Wochen alt	142 \pm 3	
Patient O.E., ♂, 57 Jahre alt	192 \pm 4	

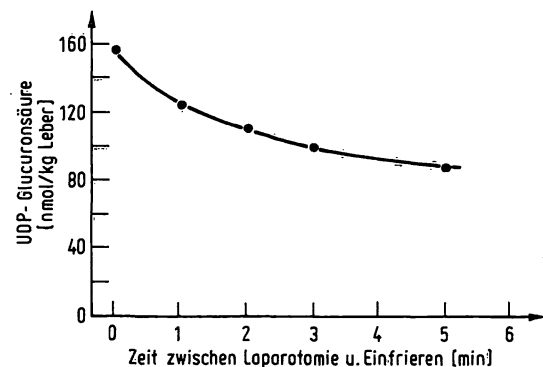


Abb. 2. Effekt der Lagerung von Leberproben in physiologischer NaCl-Lösung bei Raumtemperatur auf den UDP-Glucuronsäure-Gehalt. Der Versuch zeigt, daß die Zeit zwischen Laparotomie bzw. Punktion und Einfrieren der Probe kurz gehalten werden muß.

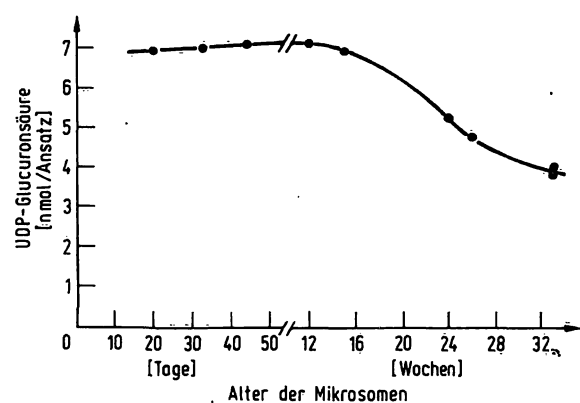


Abb. 3. Einfluß der Lagerung der Meerschweinchenmikrosomen bei -20°C auf den Umsatz von UDP-Glucuronsäure mit p-Nitrophenol. Die Mikrosomen können ohne Aktivitätsverlust mindestens 12 Wochen verwendet werden.

mungen nach logarithmischer Transformation ermittelte Variationskoeffizient beträgt $\pm 2,3\%$. Die Wiederfindung liegt zwischen 96 und 103% (Tab. 2).

Tab. 2. Versuche zur Richtigkeit der Analysen. Die Zahlen belegen die Richtigkeit der Ergebnisse über einen weiten Konzentrationsbereich.

UDP-Glucuronsäure [nmol/Probe] eingesetzt	gemessen	Wiederfindung
0,258	0,265	1,03
0,774	0,797	1,03
1,032	1,058	1,03
1,546	1,582	1,02
2,064	1,990	0,96

In der Mäuseleber wurden UDP-Glucuronsäure-Werte zwischen 164 und 201 $\mu\text{mol/kg}$ gefunden.

Der UDP-Glucuronsäure-Gehalt in menschlichem Lebergewebe konnte in zwei Fällen bestimmt werden (Tab. 1). Beide Gewebeproben wurden während einer Laparotomie entnommen. M.D. hatte eine Hyperbilirubinämie, die auf einen Morbus *Crigler-Najjar* beruhte, d.h. auf einen angeborenen Defekt der UDP-Glucuronyltransferase.

Literatur

1. Hess, R. & Pearce, A. G. (1961), *Experientia* 17, 317–318.
2. Felsher, B. F., Maidman, J. E., Carpio, N. M., Van Couvering, K. & Woolley, M. M. (1978), *Pediatr. Res.* 12, 838–840.
3. Schröter, W. & Eggerling, U. (1965), *Klin. Wochenschr.* 43, 829–834.
4. Wong, K. P. & Sourkes, T. L. (1967), *Anal. Biochem.* 21, 444–453.
5. Zhivkov, V. (1970), *Biochem. J.* 120, 505–508.
6. Keppler, D.O.R., Rudigier, J. F. M., Bischoff, E. & Decker, K. F. A. (1970), *Eur. J. Biochem.* 17, 246–253.
7. Wong, K. P. (1977), *Anal. Biochem.* 82, 559–563.
8. Lehnert, W., Limberg, J. & Künzer, W. (1974), *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 12, 23–27.
9. Schneider, W. C. & Hogeboom, G. H. (1960), *J. Biol. Chem.* 183, 123–128.
10. Pogell, B. M. & Leloir, L. F. (1961), *J. Biol. Chem.* 236, 293–298.
11. Dutton, G. J. (1966), *Glucuronic Acid, Free and Combined*. Academic Press New York and London S. 249.

Dr. W. Lehnert
Univ.-Kinderklinik
Mathildenstr. 1
D-7800 Freiburg/Br.

